

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 38 10 803 A 1**

⑤1 Int. Cl. 4:
A61 L 27/00
C 12 N 5/00

②1 Aktenzeichen: P 38 10 803.8
②2 Anmeldetag: 30. 3. 88
④3 Offenlegungstag: 12. 10. 89

Behördeneigentum

DE 3810803 A1

⑦1 Anmelder:
Battelle-Institut eV, 6000 Frankfurt, DE

⑦2 Erfinder:
Heide, Helmut, Dr., 6233 Kelkheim, DE; Jones,
David, Dr., 4400 Münster, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines synthetischen Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaften.

Hierbei werden menschliche Knochenzellen (Präosteoblasten und Osteoblasten) extrakorporal auf dem knochenähnlichen Material ähnlich calciumphosphatischen Werkstoffen, Substratmaterialien in Form von Biopolymeren oder Mischungen aus beiden gezüchtet.

DE 3810803 A1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung lebender Knochenersatzmaterialien durch extrakorporale Züchtung autogener Knochenzellen auf Calciumphosphatmaterial und/oder organischen Substanzen, wobei ein "Verbundmaterial" entsteht, welches dem Patienten reimplantiert werden kann, von dem zuvor entsprechende Knochenzellen entnommen wurden.

In der orthopädischen Chirurgie besteht ein dringender Bedarf an Knochenersatz, mit dem auch größere Defekte überbrückt und geheilt werden können. Solcher Knochenersatz findet Einsatz z. B. bei folgenden Indikationen:

- In der Traumatologie bei ausgedehnten Trümmerbrüchen und großen Defekten;
- bei onkologischen Operationen zur endgültigen Stabilisierung und Ausfüllung des Defektes;
- bei schweren Wirbelsäulendeformitäten werden in großem Umfang Knochen transplantiert;
- beim künstlichen Gelenkersatz;
- in der Kieferchirurgie u. a.

Da autologer Knochen (d. h. Knochen desselben Patienten) nur im begrenzten Maße zur Verfügung steht, wurden bisher homologe Knochen aus der Knochenbank eingesetzt. Bei ständig steigendem Bedarf wird das Angebot an immunologisch geeignetem Material jedoch zunehmend geringer. Deshalb ist z. B. schon versucht worden, keramische Werkstoffe auf der Basis von Calciumphosphaten, denen eine gewisse osteo-induktive Wirkung zugeschrieben wird, in die betreffenden defekten Stellen des Körpers einzusetzen. Derartige Möglichkeiten konnten aber die Aufgabe zur Therapie größerer Knochendefekte nicht erfüllen, weil nur kleinere Defekte überbrückt werden könnten. Die biologische Wirkungsweise derartiger Materialien ist zudem nach wie vor unklar.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knochenmaterial mit körpereigenen Eigenschaften herzustellen, das von seinen Ausmaßen her genügend groß ist, um auch größere Defekte überbrücken zu können.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht im Prinzip darin, knochenbildende Zellen, wie z. B. Osteoblasten aus der Zellkultur, extrakorporal mit calciumphosphatischen Werkstoffen, die chemisch dem Knochenmaterial ähnlich sind, und/oder Substratmaterialien in Form von Biopolymeren zu kombinieren und auf diesen Materialien zu kultivieren. Dabei sollen die gewissermaßen als Matrix dienenden Werkstoffe und Substratmaterialien so beschaffen sein, daß sie günstige Lebensbedingungen für die extrakorporale Entwicklung von lebenden Knochenzellen bieten, so daß sich diese auch gut vermehren lassen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß die Verwendung calciumphosphatischen Materials einer Zusammensetzung möglichst nahe dem Verhältnis $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5=3:1$ diese Anforderungen erfüllt. Diesem Verhältnis entsprechen die Verbindungen Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit (vgl. Abb. 3). Hiermit wurde es möglich, auch eine kurzfristige Generierung von Knochenmaterial zu gewährleisten.

Eine besonders vorteilhafte Verfahrensmaßnahme besteht darin, die auf den CaP-Matrizen abgelagerten Zellkulturen in Zellgeneratoren (Abb. 1) ständig von Nährlösung umströmen zu lassen, um sie so optimal mit der Nährlösung zu versorgen sowie gleichzeitig lokale

Übersättigungszustände aus den lebenden Zellkulturen zu beseitigen.

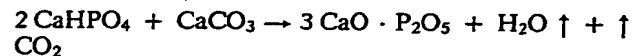
Das vorzugsweise poröse CaP-Matrixmaterial kann durch seine äußere Erscheinungsform, z. B. Granulate oder monolithische Formteile mit durchgehenden Poren (Abb. 2 b) optimal an unterschiedliche Indikationssituationen angepaßt werden.

Ähnlich positive Ergebnisse konnten mit Substratmaterialien in Form von Biopolymeren wie Kollagen Typ I erzielt werden. Kombiniert man die erfindungsgemäßen Biopolymere mit den erfindungsgemäßen CaP-Materialien, so läßt sich das Ergebnis des erfindungsgemäßen Verfahrens noch weiter verbessern.

Beispiele:

1. CaP-Matrix

Als eine besonders günstige Ausführungsart für die CaP-Matrizen wurde die Verbindung Tricalciumphosphat (β -Whitlockit) aus stöchiometrischen Mischungen aus CaHPO_4 und CaCO_3 durch Sintern über mehr als 8 h bei 1100°C gemäß der Formel



hergestellt, die entstandenen massiven Probematerialien wurden spanabhebend und mittels Bohren in durchgängig poröse Formstücke (Abb. 2 b) überführt.

Hierbei muß durch diese Wahl der Synthesebedingungen sichergestellt sein, daß die gemäß Abb. 3 mit Tricalciumphosphat ($3 \text{CaO} \times \text{P}_2\text{O}_5$) koexistierenden Phasen Dicalcium- und Tetracalciumphosphat möglichst nicht gebildet werden bzw. durch möglichst vollständigen Umsatz verschwinden, da diese letzteren Verbindungen zellschädigende pH-Werte entwickeln und dadurch die Entwicklung der Zellkulturen beeinträchtigen.

2. Kollagen-Matrix

Die Herstellung von Kollagen entsprechender Reinheit, d. h. ohne immunologisch bedenkliche Proteine, erfolgt nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsart aus tierischen Knochen, vorzugsweise vom Kalb, aber auch vom Menschen. Hierzu werden Knochenstücke in 0,2 normaler HCl entkalkt, sodann wird das entkalkte Material mit Pepsin oder anderen Proteasen behandelt, welche die nicht-kollagenen Proteine "verdauen" und abbauen. Das verbleibende gelförmige Kollagen wird mit HCl oder Essigsäure gelöst und durch Zugabe von CaCl_2 -Lösung bei 4°C ausgefällt und von der Lösung getrennt (1. Reinigungsschritt). Zur weiteren Reinigung wird das Kollagen wiederum in HCl aufgelöst und durch erneute Zugabe von CaCl_2 -Lösung ausgefällt. Diese Reinigung wird insgesamt dreimal wiederholt, wobei ein hochreines, von Fremdproteinen freies Kollagen, Typ I gewonnen wird.

Die Viskosität und der Vernetzungsgrad dieses Kollagens, welches zur Herstellung der Züchtungsmatrix benutzt wird, kann durch die Ca^{2+} -Konzentration in weiten Grenzen eingestellt werden.

3. Anzucht der Zellkultur

Hinsichtlich der Anzucht menschlicher Osteoblastenzellen erwies sich folgender Weg als vorteilhaft: Die aus

dem Beckenkamm eines Menschen intra operationem entnommenen Knochenstückchen wurden mittels physiologischer Kochsalzlösung nach Dulbecco von Blut gereinigt und mit 5000 E/ml und 5000 µg/ml Penicillin-streptomycin zum Schutz gegen Infektionen behandelt. 5
Nach nochmaliger Reinigung werden die so behandelten Knochenproben in einer Nährlösung aus 10% fötalem Kälberserum ernährt (37°C, 5% CO₂, 20% O₂ und 100% relative Luftfeuchtigkeit). Die Nährlösung wurde alle 2 Tage gewechselt. Hierdurch wachsen die Zellkul- 10
turen und differenzieren sich zu Osteoblasten.

monolithischer, dem zu behandelnden Knochende-
fekt angepaßter Form vorliegen.

4. Vermehrung der Zellkultur und Bildung des "Verbundmaterials"

Die so angezüchteten Osteoblasten werden nach einer vorteilhaften Arbeitsweise mittels 0,03% Ethylendi-
nitrotetraessigsäure-Lösung dispergiert und mit einer
berechneten Konzentration von ca. 3600 Zellen/cm²
Substrat in die poröse Calciumphosphat-Matrix einge- 20
schwemmt. Nach einer zweistündigen Ruhezeit haben
sich die Zellen auf der Keramik abgesetzt. Dann wird
mit der Durchflutung der Zelle mit Nährlösung begon-
nen. Die chemische Zusammensetzung und insbesonde-
re der P_H, PCO₂, PO₂ werden in der austretenden Lösung 25
laufend gemessen. Wenn sich die Lösung durch die Zel-
laktivität und durch partielle Anlösung der CaP-Matrize
meßbar ändert, wird die einströmende Nährlösung ent-
sprechend korrigiert. So ist gewährleistet, daß die Zellen
stets optimale Lebensbedingungen behalten und die ge- 30
samte durchströmte Matrize oberflächlich mit einem
dichten "Zellrasen" überziehen. Dies ist nach ca. 2 Wo-
chen der Fall.

Patentansprüche

35

1. Verfahren zur Herstellung eines synthetischen
Knochenmaterials mit körpereigenen Eigenschaf-
ten, **dadurch gekennzeichnet**, daß man menschi- 40
che Knochenzellen (Präosteoblasten und Osteobla-
sten) extrakorporal auf den dem natürlichen Kno-
chenmineral ähnlichen calciumphosphatischen
Werkstoffen, Substratmaterialien in Form von Bio-
polymeren oder Mischungen aus beiden züchtet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn- 45
zeichnet, daß man als calciumphosphatische Werk-
stoffe dem Verhältnis CaO:P₂O₅ = 3:1 möglichst
eng entsprechende Calciumphosphate und als Bio-
polymere Kollagen verwendet.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch ge- 50
kennzeichnet, daß man autologe Knochenzellen
verwendet.
4. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch ge-
kennzeichnet, daß man einem fremden, aber immu-
nologisch geeigneten Patienten entstammende 55
Knochenzellen verwendet.
5. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch ge-
kennzeichnet, daß man die auf den Matrizen abge-
lagerten Zellkulturen von der Nährlösung ständig
umströmen läßt. 60
6. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 5, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die Matrixmaterialien eine
durchgängige poröse Form haben.
7. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die Matrixmaterialien in granu- 65
lärer Form vorliegen.
8. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die porösen Matrixmaterialien in

- Leerseite -

nummer:
Cl.4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

38 10 803
A 61 L 27/00
30. März 1988
12. Oktober 1989

3810803

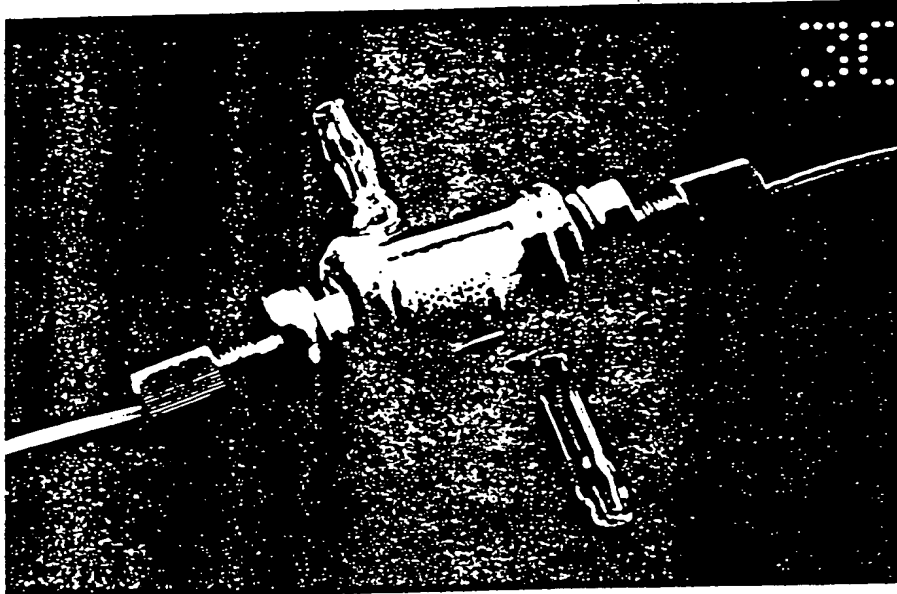


ABB. 1



ABB. 2 a

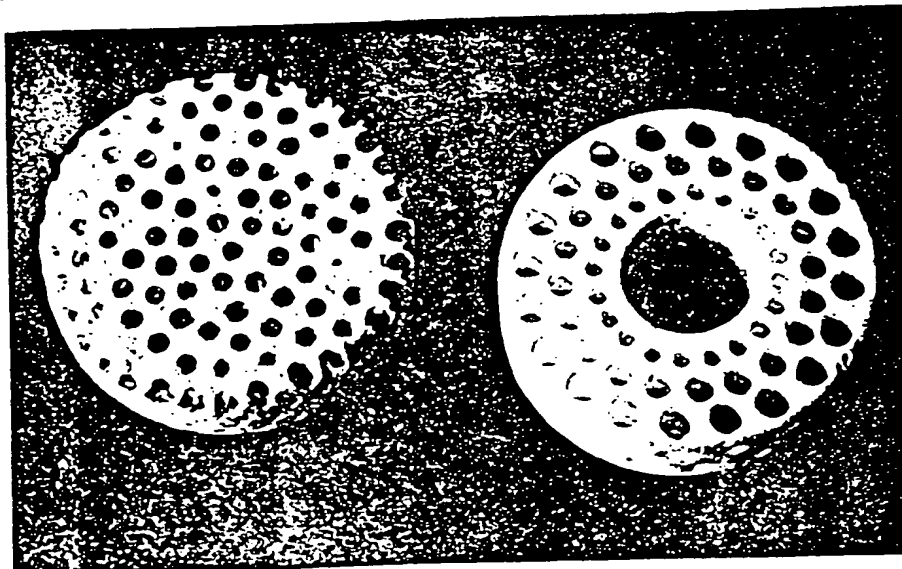


ABB. 2 b

3810803

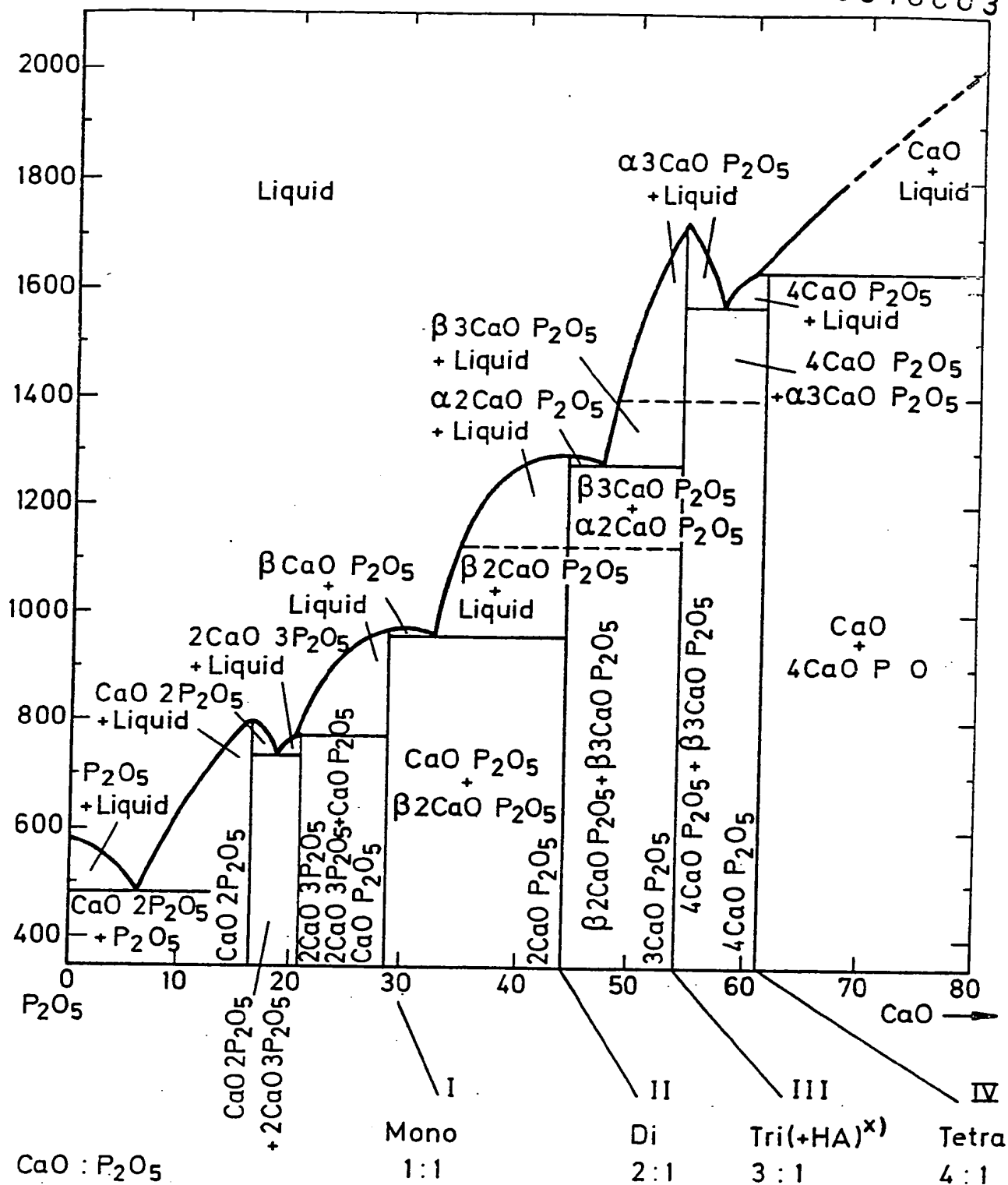
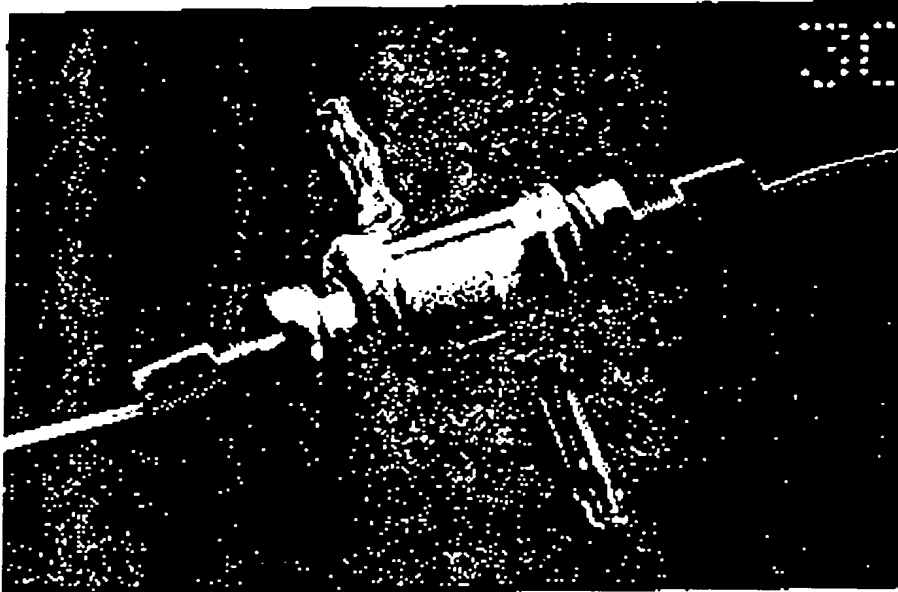


Fig.3

Nummer:
CL:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

38 10 808
A 61 L 27/00
30. März 1988
12. Oktober 1989

3810803



8
ABB. 1



ABB. 2 a

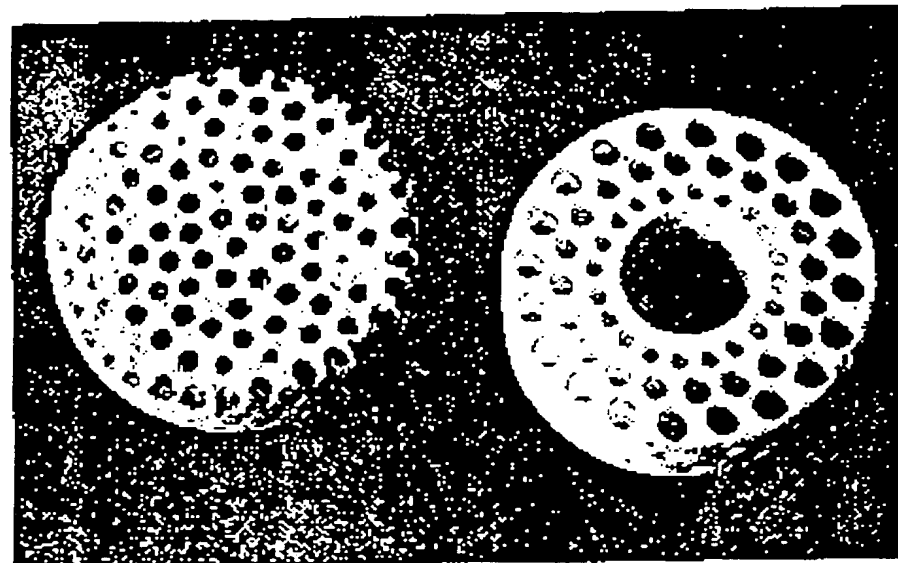


ABB. 2 b

900 B41/2B1

9*

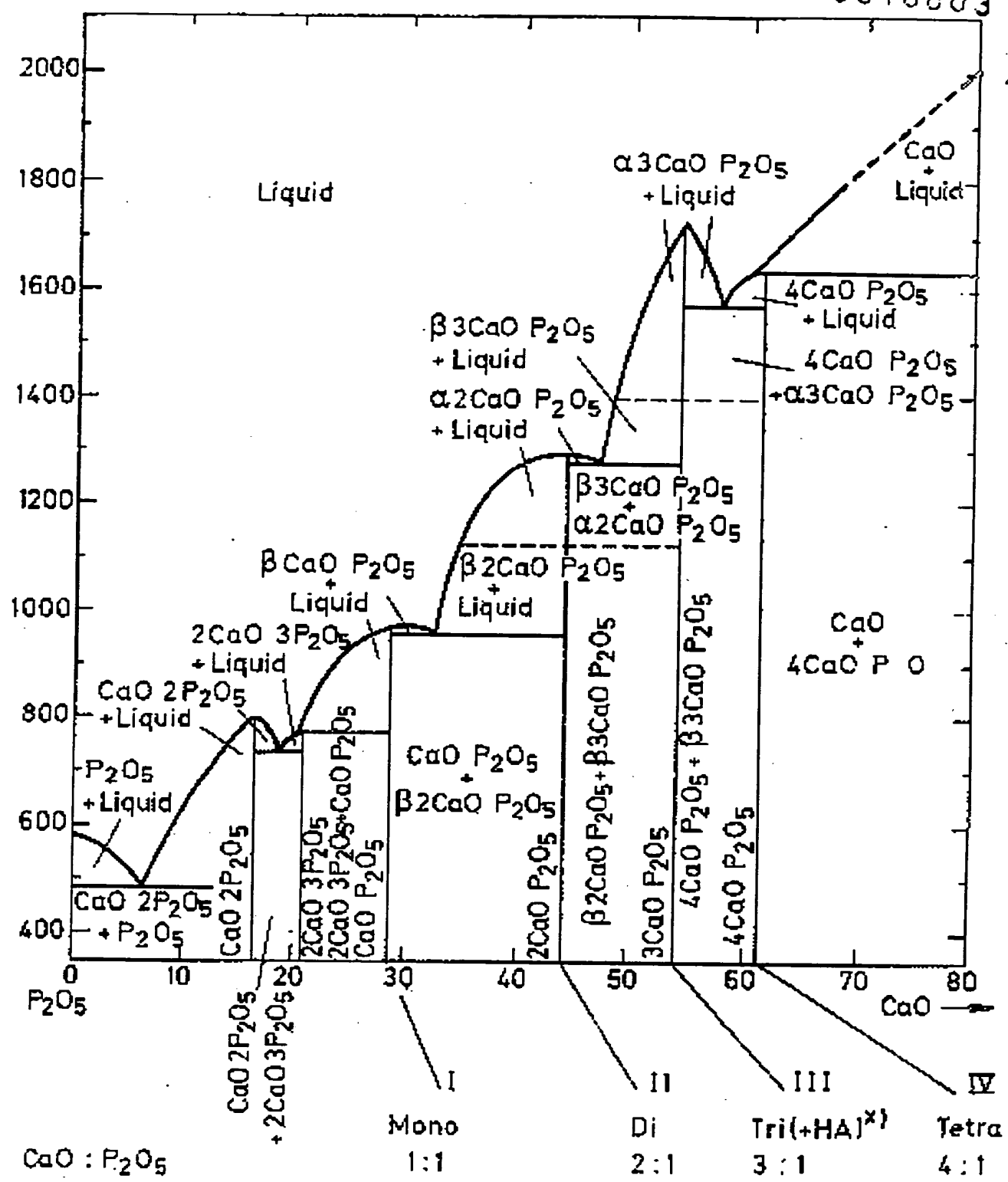


Fig.3